



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ANTIMIKROBIÁLNÍ MATERIÁLY NA BÁZI
NANOSTRUKTUR S ENZYMY**

ANTIMICROBIAL MATERIALS BASED ON NANOSTRUCTURES WITH ENZYMES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bronislava Jurová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1514/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bronislava Jurová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Antimikrobiální materiály na bázi nanostruktur s enzymy

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) rešerše – antimikrobiální látky, jejich struktura; enzymy s antimikrobiálním účinkem
- 2) příprava nanomateriálů s antimikrobiálním účinkem
- 3) příprava a charakterizace antimikrobiálních gelů a krytů s obsahem antimikrobiálních složek a enzymů

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Bronislava Jurová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu a charakterizaci antimikrobiálních gelů a krytů s obsahem antimikrobiálních složek a enzymů. Teoretická část se zabývá stručnou charakteristikou antimikrobiálních látek, jejich strukturou a převážně enzymy s antimikrobiálním účinkem. Jsou zde uvedeny také metody, které se použily při jejich testování.

Praktická část se zabývá testováním antimikrobiálních účinků extraktů ze skořice a hřebíčku, hřebíčkové silice, lysozymu a bromelainu proti *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Candida glabrata*. Z vybraného koření byly připraveny různé typy extraktů, konkrétně extrakty vodné a ethanolové v odlišném procentuálním zastoupení. Jednotlivé extrakty byly charakterizovány a dle celkového zastoupení fenolických látek byly vybrány nejlepší pro enkapsulaci do liposomových částic a gelů. Extrakty a enzymy byly také přidány do hydrogelu a nevlákných krytů. Pro přípravu nevlákných krytů byl použit roztok alginátu sodného a chitosanu. K testování antimikrobiálních účinků na dané mikroorganismy byla použita bujónová diluční metoda. Dále byla pomocí metody forcespinningu připravena nanovláknna na bázi PHB. Tato nanovláknna byla obohacena hřebíčkovou silicí a byla sledována jejich antioxidační aktivita.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antimikrobiální látky, enzymy, antimikrobiální aktivita, liposomy

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the preparation and characterization of antimicrobial gels and coatings containing antimicrobial components and enzymes. The theoretical part deals with a brief description of antimicrobial substances, their structure and mainly enzymes with antimicrobial effect. The methods used in the testing are also listed here.

The practical part deals with testing the antimicrobial effects of extracts from cinnamon and cloves, clove essential oil, lysozyme and bromelain against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* and *Candida glabrata*. Various types of extracts were prepared from the selected spices, namely aqueous and ethanol extracts in different percentages. The individual extracts were characterized and, according to the total proportion of phenolic substances, the best ones were selected for encapsulation in liposome particles and gels. Extracts and enzymes were also added to the hydrogel and non-fibrous covers. A solution of sodium alginate and chitosan was used to prepare non-fibrous covers. A broth dilution method was used to test the antimicrobial effects on the given microorganisms. Furthermore, nanofibers based on PHB were prepared using the forcespinning method. These nanofibers were enriched with clove essential oil and their antioxidant activity was monitored.

KEYWORDS

Antimicrobials, enzymes, antimicrobial activity, liposomes

JUROVÁ, Bronislava. Antimikrobiální materiály na bázi nanostruktur s enzymy. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. 48s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

..... podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Renatě Pavelkové za cenné rady, pomoc, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovala. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině a přátelům za trpělivost a podporu při studiu.

Obsah

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Antimikrobiální látky.....	10
2.1.1	Fenolické látky	10
2.1.2	Antimikrobiální peptidy	10
2.1.3	Antimikrobiální aktivita	10
2.2	Enzymy	11
2.2.1	Klasifikace enzymů.....	11
2.2.2	Využití enzymů	12
2.3	Enzymy s antimikrobiálním účinkem	13
2.3.1	Lysozym.....	13
2.3.2	Kolagenáza.....	16
2.3.3	Bromelain.....	16
2.4	Stanovení antimikrobiálního účinku.....	16
2.4.1	Kvantitativní – diluční metody	16
2.4.2	Kvalitativní – difúzní metody	17
2.5	Mikroorganismy	18
2.5.1	Buněčná stěna Gram pozitivních bakterií	18
2.5.2	Buněčná stěna Gram negativních bakterií	19
2.5.3	Kultivace mikroorganismů.....	20
2.6	Imobilizace enzymů.....	20
2.6.1	Enkapsulace aktivních látek.....	20
2.7	Nosiče pro imobilizaci enzymů	20
2.7.1	Alginát.....	20
2.7.2	Chitosan	21
2.7.1	PHA.....	21
2.8	Liposomy	22
2.9	Charakterizace částic	22
2.9.1	Stanovení stability částic.....	22
2.9.2	Stanovení velikosti částic.....	22
3	CÍL PRÁCE	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24

4.1	Použité chemikálie	24
4.1.1	Chemikálie použité ke spektrometrickým stanovením	24
4.1.2	Chemikálie použité na přípravu částic	24
4.1.3	Chemikálie použité na přípravu krytů	24
4.1.4	Chemikálie použité na kultivaci mikroorganismů	24
4.2	Přístroje a pomůcky	25
4.3	Použité mikroorganismy	25
4.4	Použité přírodní materiály	25
4.5	Příprava extraktů	26
4.6	Charakterizace aktivních látek	26
4.6.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	26
4.6.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	26
4.6.3	Stanovení antioxidační aktivity	26
4.7	Příprava liposomových částic	27
4.8	Charakterizace liposomových částic	27
4.8.1	Stanovení velikosti a stability liposomových částic	27
4.8.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	27
4.9	Příprava xanthanových gelů	27
4.10	Příprava nevlákenných krytů	27
4.11	Antimikrobiální testy	28
4.11.1	Příprava médií	28
4.11.2	Kultivace mikroorganismů	29
4.11.3	Bujónová diluční metoda	29
4.12	Příprava nanovlákných krytů na bázi PHB	29
4.12.1	Metoda forcespinning	30
4.13	Antioxidační aktivita nanovlákných krytů	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
5.1	Charakterizace extraktů	31
5.1.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	31
5.1.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	32
5.2	Charakterizace liposomových částic	33
5.2.1	Stanovení velikosti částic s enkapsulovanými extrakty	33
5.2.2	Stanovení stability připravených částic	34

5.2.3	Stanovení enkapsulační účinnosti	34
5.3	Příprava a optimalizace přípravy nevlákenných krytů	35
5.4	Antimikrobiální testy	36
5.5	Příprava a optimalizace přípravy nanovláknenných krytů	38
5.6	Stanovení antioxidační aktivity nanovláknenných krytů.....	39
6	ZÁVĚR	41
7	ZDROJE.....	43
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	48

1 ÚVOD

Nanotechnologie je slovo využívané k popisu široké škály různých technologií a materiálů, které sdílejí jednu společnou věc – jejich velmi malou velikost. Nanometr je jedna miliardtina metru: desetinásobek průměru atomu vodíku. Pro srovnání, lidské vlasy mají průměrně 80 000 nanometrů, červené krvinky jsou přibližně 5 000 nanometrů široké a jednoduché organické molekuly mají velikost v rozmezí 0,5 do 5 nanometrů. V takovém měřítku již neplatí běžná pravidla fyziky a chemie.

Jak řekl Horst Ludwig Störmer, nositel Nobelovy ceny za fyziku: „Nanotechnologie nám dala nástroj, abychom si mohli hrát s těmi nejmenšími hračkami přírody – s atomy a molekulami. Vše je z nich postaveno. Možnost vytváření nových věcí se zdá být nekonečná.“

Široké uplatnění nachází nanotechnologie v medicíně, například v krytí ran. Proces hojení ran je složitý sled dobře organizovaných biochemických a buněčných jevů, které obnovují integritu kůže a podkožní tkáně. Všudypřítomný problém v léčbě ran představují bakteriální infekce.

Tato práce je zaměřena na antimikrobiální gely a kryty na bázi nanostruktur s enzymy. Enzymy jsou látky bílkovinné povahy s katalytickou aktivitou, kde nejrozšířenější enzymy s antimikrobiálními vlastnostmi jsou například lysozym, kolagenáza nebo bromelain. Ve srovnání s chemickými a mechanickými metodami je enzymatické šetření ran velmi šetrné a nepoškozuje zdravou tkáň.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky jsou definovány jako látky, které buď ničí mikroorganismy, nebo inhibují jejich růst. Podle typu jejich aktivity můžeme antimikrobiální látky dělit na antibakteriální, antimykotické, antiparazitní a antivirové. Funkcí antimikrobiálního činidla je usmrcení mikroorganismu nebo inhibice jeho růstového procesu, a toho je dosaženo schopnostmi jako např. proniknutím nebo narušením buněčné stěny, inhibicí syntézy buněčné stěny, změnou propustnosti buněčné stěny, inhibicí syntézy proteinů a nukleových kyselin nebo inhibicí enzymatické aktivity [1].

2.1.1 Fenolické látky

Mezi přírodní antimikrobiální zdroje patří převážně fenolické látky, které se vyskytují ve většině potravin rostlinného původu. Jedná se o látky, které mají obvykle aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin. Existuje několik tisíc sloučenin, od jednoduchých fenolových kyselin po komplexní flavonoidy [2].

2.1.2 Antimikrobiální peptidy

U stále narůstajícího počtu bakterií se v důsledku nadměrného používání antibiotik vyvinula vůči nim rezistence. Proto se musela najít alternativa. Velký zájem připoutaly antimikrobiální peptidy, které dosahují velmi silných antimikrobiálních či protizánětlivých účinků. Klíčovou roli v této antimikrobiální aktivitě hraje peptidová interakce se složkami bakteriální membrány a její následná destabilizace. Antimikrobiální peptidy jsou v přírodě všudypřítomné a jsou účinné proti celé řadě mikroorganismů. Příkladem antimikrobiálního peptidu je například nisin, který je účinný převážně proti mnoha gram-pozitivním organismům, nebo epidermin [3–4].

2.1.3 Antimikrobiální aktivita

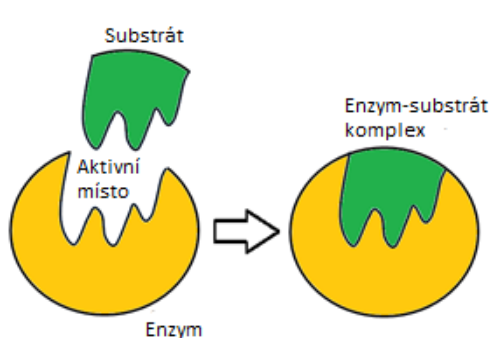
Antimikrobiální aktivitu lze definovat jako souhrnný pojem pro všechny aktivní látky, které inhibují růst bakterií, zabraňují tvorbě mikrobiálních kolonií nebo mohou mikroorganismy usmrcovat. Látky, které vykazují antimikrobiální aktivitu, jsou ovlivněny teplotou, hodnotou pH, složením prostředí a typem mikroorganismu [5].

Stupeň účinku je označen příponou –cidní (nebo smrtící), jestliže se jedná o usmrcení bakterií, nebo se využívá přípona –statický, pokud účinná látka slouží pouze k inhibici růstu bakterií. V antimikrobiální oblasti se tedy využívá termínů jako antibakteriální, baktericidní, bakteriostatický, fungicidní, fungistatický nebo biocidní a biostatický [5].

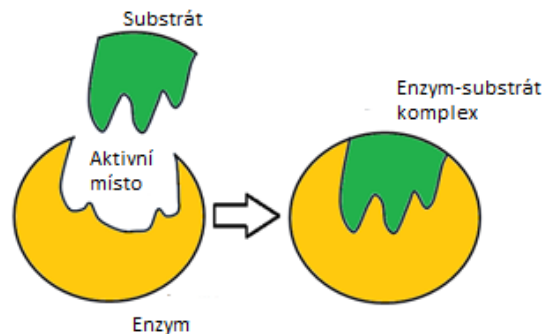
Antibakteriální aktivita je nejběžnějším typem antimikrobiální aktivity. Jde o aktivitu, která působí pouze na bakterie, v případě, že účinkuje na kvasinky a vláknité houby, nazýváme tuto aktivitu antimykotickou [5].

2.2 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, vybavené katalytickými funkcemi, které urychlují chemické přeměny. Téměř všechny enzymy jsou proteiny (ukázalo se, že i molekuly RNA jsou častými biokatalyzátory). Nejvýznamnější charakteristikou je jejich specifita a katalytická síla. Velká část katalytické síly enzymů pochází z jejich spojení se substráty v komplex enzym-substrát. Substráty jsou vázány na specifickou oblast enzymu zvanou aktivní místo. Jejich specifický vztah je podobný vztahu klíče a zámku (Obrázek 1: Teorie klíče a zámku [7]). Druhou teorií je teorie indukovaného přizpůsobení (Obrázek 2: Teorie indukovaného přizpůsobení [8]), která tvrdí, že aktivní místo se přizpůsobuje substrátu [6].



Obrázek 1: Teorie klíče a zámku [7]



Obrázek 2: Teorie indukovaného přizpůsobení [8]

2.2.1 Klasifikace enzymů

Enzymy se podle typu katalyzované reakce dělí do šesti hlavní tříd:

1. Oxidoreduktázy

Katalyzují intermolekulové oxidačně redukční reakce přenosem vodíku nebo elektronů mezi substrátem a akceptorem, nebo včleňováním atomů kyslíku do molekuly substrátů. Jako kofaktory oxidoreduktáz slouží hlavně pyridinové (NAD^+ , NADP^+) a flavinové (FAD , FMN) struktury [9].

2. Transferázy

Transferázy se podílejí na přenosu skupin ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$ apod.) v aktivované formě z jejich donoru na akceptor. Účastní se řady biosyntetických dějů [6, 9].

3. Hydrolázy

Hydrolyticky štěpí vazby, které vznikly kondenzací. Kondenzace je například peptidová, glykosidová nebo esterová [9].

4. Lyázy

Lyázy jsou enzymy, které katalyzují nehydrolytický rozklad substrátů na dvě sloučeniny, a za podmínek v buňkách často i obrácenou reakci [9].

5. Izomerázy

Izomerázy tvoří skupinu enzymů, které v organismech udržují rovnováhu mezi dvěma izomery. Realizují tedy vnitromolekulové přenosy atomů a jejich skupin. Dělení na podtřídy je založeno na typu izomerie [6, 9].

6. Ligázy

Katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu látky uvolňující energii, např. ATP [9].

2.2.2 Využití enzymů

2.2.2.1 Použití enzymů ve farmacii

Enzymy jsou velmi cennými složkami ve farmaceutických přípravcích díky svým důležitým rysům, které je odlišují od ostatních druhů léků. Jedním z těchto rysů je jejich afinita a specifická vazba se substrátem. Druhou vlastností je katalýza a schopnost vícenásobně měnit cílové molekuly na požadované produkty. Nezanedbatelnou předností enzymů při jejich aplikaci je jejich netoxičnost, kdy umělé katalyzátory jsou většinou toxické. Tyto charakteristiky vedou k vývoji mnoha léčiv pro širokou škálu onemocnění [10].

Použití enzymů bylo zaznamenáno již ve starověkém Egyptě, kde byly enzymy používány k uchování potravin a nápojů. V roce 400 př.n.l. Homerova Illias zmínila použití enzymů z dětského žaludku k výrobě sýrů [11].

Terapeutické enzymy mají využití jako onkolytika a trombolytika. Proteolytické enzymy slouží zase jako protizánětlivé látky [10].

2.2.2.2 Léčba poškozené tkáně

Mnoho proteolytických enzymů rostlinného i bakteriálního původu slouží k odstranění odumřelé kůže při popáleninách. Hojení při poškození nervové tkáně napomáhá například hyaluronidáza, podobná svou hydrolytickou aktivitou chondroitin sulfátu [10, 12].

Chondroitinázy napomáhají při zranění míchy tak, že odstraní gliální jizvy a tím i hromadění chondroitin sulfátu, který zastavuje růst axonů [10, 12].

2.2.2.3 Léčba bakteriálního onemocnění

Lysozym se vyskytuje v mnoha potravinách a spotřebních výrobcích, neboť je schopen rozkládat sacharidové řetězce v bakteriální buněčné stěně. Objeven byl také lysozym mající schopnost bojovat s HIV infekcí [12].

Chitinázy jsou dalším přirozeně se vyskytujícím antimikrobiálním činidlem. Chitin je vedle celulózy nejrozšířenějším polysacharidem na Zemi. Jsou jím tvořeny buněčné stěny například hub a prvoků, a jsou tedy dobrým cílem pro získ antimikrobiálních látek [12].

2.2.2.4 Léčba rakoviny

Normální zdravé buňky jsou schopny syntetizovat asparagin, ale rakovinové buňky nemohou, a tedy v přítomnosti enzymu degradující asparagin umírají. Asparagináza a PEG – asparagináza jsou účinnými enzymy pro chemoterapie [10].

2.2.2.5 Použití enzymů v potravinářském průmyslu

V pivovarství se enzymové stabilizátory využívají k odstranění chladového zákalu piva, neboť enzymy degradují bílkoviny a tím zamezují tvorbu zákalu. K této prevenci se využívají preparáty obsahující ficin, papain, bromelain nebo i pepsin [9].

Amylázy se využívají k pečení, přípravě moučníků a ovocných šťáv. Tyto enzymy se přidávají například do těsta chleba, aby se rozložil škrob a tím se zvýšila rychlost fermentace a snížila viskozita těsta [9].

Enzymy se dále využívají například v masném průmyslu, kde slouží k tenderizaci masa, nebo i v mlékárenském průmyslu, jako syřidla [9].

2.2.2.6 Použití enzymů v průmyslu čisticích prostředků

Aplikace enzymů při výrobě detergentů zvyšuje schopnost odstranit skvrny. Čisticí prostředek je také šetrný k životnímu prostředí. Důvod přidávání proteáz do pracích prostředků je ten, že proteáza degraduje denaturovanou bílkovinu ulpívající na prádle na štěpy (peptidy), a tím se špína lehce odstraní [9].

2.3 Enzymy s antimikrobiálním účinkem

2.3.1 Lysozym

Lysozym, též zvaný muramidáza nebo N-acetylmuramidglykanhydroláza, je glykosidická hydroláza, která katalyzuje hydrolýzu β -1,4-glykosidické vazby mezi N-acetylmuranovou a N-acetyl-D-glukosaminovými zbytky v peptidoglykanu, který je hlavní složkou Gram pozitivní buněčné stěny bakterií [13].

Lysozomy jsou rozšířené v rostlinách a zvířatech, kde představují přirozený obranný mechanismus proti bakteriálním patogenům. U zvířat byly identifikovány tři odlišné typy lysozymů, označovány jako c-typ (kuřecí typ – HEWL), g-typ (husí typ – GEWL) a i-typ (bezobratlý typ) [14].

Virové enzymy jsou klasifikovány do typu ν (T4), typu X, typu g a typu CH. Lysozomy objevené v rostlinách jsou klasifikovány do chitináz – lysozymů typu h a b [15].

2.3.1.1 Historie výzkumu lysozymu

Historií objevu lysozymu se ve své práci zabývá Rau. První zmínky o látce ve vaječném bílku, která je schopna lytického působení na bakterie, se objevily již na začátku 20. století [16–17].

Profesor Lastchenko zpozoroval inhibiční činnost bílku na *Bacillus subtilis*. Tento účinek byl poté potvrzen i u dalších bakterií, jako například u *Bacillus anthracis* nebo *Bacillus Megaterium*. Při dalších experimentech zjistil, že vaječný bílek obsahuje proteolytické enzymy, které usmrcují bakterie [16–17].

Mezi další vědce, kteří popisovali antibakteriální účinky slin a tělních sekretů, patřil Bloomfield. Bloomfield se zabýval usmrcením bakterií v horních cestách dýchacích [16–17].

Alexandr Fleming roku 1921 přišel k podobnému objevu a byl první kdo došel k závěru, že nosní sekrety obsahují látky způsobující lyzi buněk. Podle lytického působení na bakterie *Micrococcus lysodeikticus* nazval tuto látku lysozym. Ve svém záznamu popisuje, že lysozym je v lidském těle přítomný také v slzách, slinách, hlenu a tkáních, například v chrupavkách [16–17].

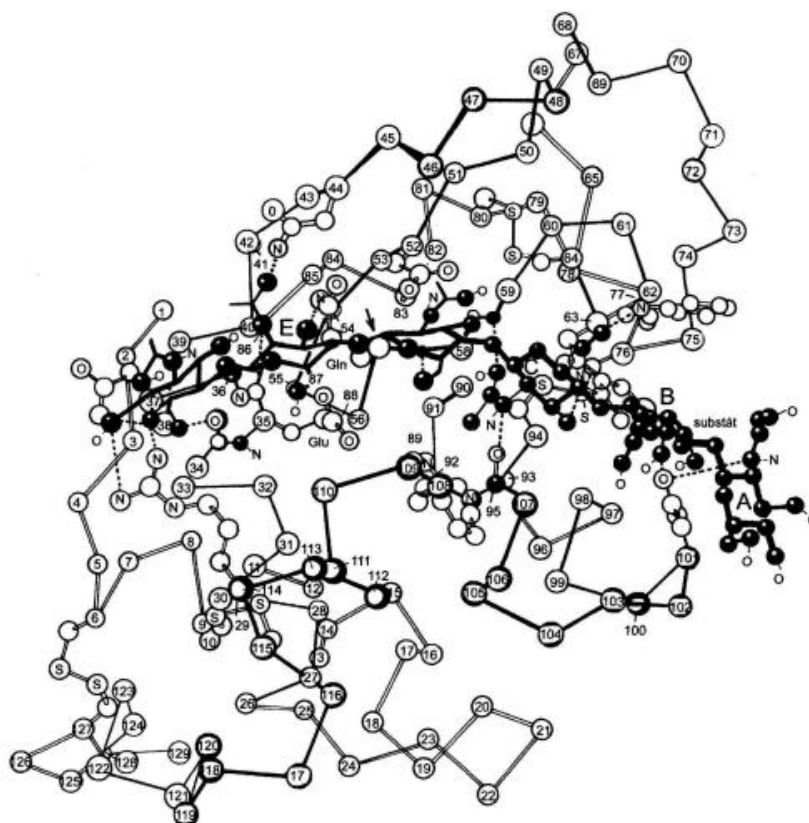
2.3.1.2 Mechanismus účinku lysozymu

Lysozym katalyzuje hydrolýzu β -1,4-glykosidické vazby mezi zbytky N-acetylmuranové kyseliny a N-acetylglukosaminem. Tím, že katalyzuje rozklad polysacharidových řetězců v buněčné stěně bakterií, dochází až k rozpadu buňky [9].

Aktivní místo ve tvaru štěrbině je schopno pojmout až 6 cukerných zbytků. Těchto 6 jednotek aminocukrů (ABCDEF) je vázáno nekovalentně vodíkovými vazbami. U zbytku D dochází ke zkroucení židličkové konformace hexosového kruhu na položidličkovou. Mezi jednotkami D a E dochází k hydrolýze β -1,4-glykosidické vazby [9,18].

Sled dějů při katalytickém štěpení je následující. Glutamát 35 je v nepolárním prostředí při pH 5 protonován a funguje jako obecný kyselý katalyzátor. Je donorem protonu, který se přesune na kyslíkový atom glykosidové vazby a vyvolá tak její přerušení. Na atomu C1 dojde ke vzniku kladného náboje, z něhož štěpná vazba vycházela. Takto vytvořený intermediární karboniový ion $C1^+$ je stabilizovaný elektrostatickou interakcí s asparátem 52. Odštěpená část a polysacharidového řetězce se zbytkem E opustí enzym [17–18].

Poslední fází je nukleofilní atak molekulou vody na karboniový ion. Ion $C1^+$ reaguje s iontem OH^- , zbylá část polysacharidového řetězce B se zbytkem D a pak opustí enzym. Poté dochází k protonaci glutamátu 35 a to zapříčiní enzymu připravenost pro další katalýzu [9, 17, 18].



Obrázek 3: Rovinná projekce zjednodušeného modelu komplexu lysozymu ze slepičích vajec se substrátem [9].

2.3.1.3 Využití lysozymu v praxi

Vzhledem k tomu, že lysozym vykazuje antibakteriální aktivitu vůči nežádoucím mikroorganismům, nachází uplatnění v mnoha oblastech, zejména v potravinářském, zdravotnickém nebo farmaceutickém průmyslu. V potravinářském průmyslu je využit jako přírodní konzervační prostředek pro maso, ryby, mléčné výrobky, ale i pro konzervaci ovoce a zeleniny. Ve farmaceutickém průmyslu nachází uplatnění jako pomocná látka při výrobě léků, především pro antibiotika a analgetika bakteriálních infekcí, ale také na léčbu nádorových onemocnění. Díky tomu, že je ukazatelem vzniku a průběhu různých patologických změn, je ve zdravotnictví používán i jako diagnostický prostředek [19–20].

Enzym je antibakteriální, protože degraduje polysacharid, který se nachází v buněčných stěnách mnoha bakterií. Antibakteriální aktivita lysozymu je ovšem omezena jen na Gram pozitivní bakterie. Účinek proti Gram negativním bakteriím je velmi malý [19–20].

Ukázalo se, že enkapsulovaný lysozym je při dekontaminaci povrchu stejně účinný, jako volný. Dokonce je více efektivní. Lýze buněk je sice pomalejší, když se použije enkapsulovaný lysozym, ale má větší účinek. Účinek lysozymu se také výrazně zvyšuje s přídavkem EDTA [19–20].

2.3.2 Kolagenáza

Kolagenáza patří mezi skupinu proteáz. Je schopna narušovat peptidové vazby v kolagenu, což je bílkovina, která je základní složkou pojivových tkání. Enzym kolagenáza tedy našel své uplatnění při léčení různého onemocnění spojeného s kůží. Používá se při hojení popálenin, kožních vředů nebo strupů, neboť pomáhá rozpadat a odstraňovat odumřelou tkáň a kůži. Také podporuje reparační mechanismus, což pomáhá lepšímu fungování antibiotik a urychlování přirozenému procesu hojení. Je využíván díky své účinnosti, zkrácení doby hojení, zabránění vzniku jizev a hypertrofie [21–24].

Kolagenáza se vytváří buď v těle jako součást imunitní odpovědi, nebo je produkována bakterie z rodu *Vibrio* a *Clostridium*. Bakterie *Vibrio* se využívají k odstranění odumřelé tkáně a kůže. *Clostridium histolyticum* je sice patogen způsobující plynatou sněť, ale z něj izolovaný enzym kolagenáza pomáhá při kožním onemocnění [21–24].

2.3.3 Bromelain

Mezi skupinu enzymů štěpící bílkoviny patří také bromelain. Je složen převážně z thiolových endopeptidáz. Mezi jeho další složky, které jsou zastoupeny v menší míře, patří například peroxidáza, celulóza, glukosidáza, fosfatáza a inhibitory proteázy. Vyskytuje se buď jako kmenový bromelain, nebo ovocný, u kterého je jedním z nejbohatších zdrojů enzymu ananas. Největší množství enzymu obsahuje stopka ananasu, avšak dá se získat pomocí centrifugace, ultrafiltrace a lyofilizace také z ananasové šťávy [25–26].

Bromelain je v lidských střevech absorbován bez degradace a ztráty biologické aktivity, jeho enzymatická aktivita lze stanovit se substráty jako je například kasein nebo želatina. Je to pomocník proti zánětům, otokům, při problémech s trávením a má dokonce i protirakovinnou aktivitu. Bromelain pomáhá při léčbě mnoha poruch. Je využíván z toho důvodu, že například urychluje vstřebávání otoku a krve v poraněném místě, odbourává nekrotickou tkáň, urychluje hojení rány a brání zánětu a zvyšuje průtok krve v oblasti rány [27–28].

2.4 Stanovení antimikrobiálního účinku

Působení antimikrobiálních látek může být mikrobistatické (reverzibilní zastavení růstu a množení mikroorganismů) nebo mikrobicidní (usmrcení mikroorganismů). Pro určitou antimikrobiální látku je vždy využívána kultura s potřebnými vlastnostmi. Výběr metody je založen na řadě různých faktorů, jako třeba na časové náročnosti, automatizaci, reprodukovatelnosti či přesnosti. Tyto metody využívané k testování antimikrobiální aktivity látek se dělí na difúzní a diluční [29–30].

2.4.1 Kvantitativní – diluční metody

U diluční metody je hodnocena minimální inhibiční koncentrace (MIC), která je definována jako nejnižší koncentrace dané antimikrobiální látky, při které dochází k potlačení viditelného růstu mikroorganismů. Testování se provádí na agarových nebo bujónových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antimikrobiální látky. Stanovení hodnoty MIC je důležité pro

určení terapeutické dávky antimikrobiální látky. Mezi nejpoužívanější metody patří agarová diluční metoda, bujónová metoda a E-test. Tyto metody jsou přesnější než metody difúzní [31–32].

2.4.1.1 Agarová diluční metoda

Jedná se o referenční metodu stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Při testování se standardní inokulum vyšetřovaných bakterií nanáší na povrch agarových médií. Po inkubaci se hledá nejnížší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje růst daného kmene [31–32].

2.4.1.2 Bujónová diluční metoda

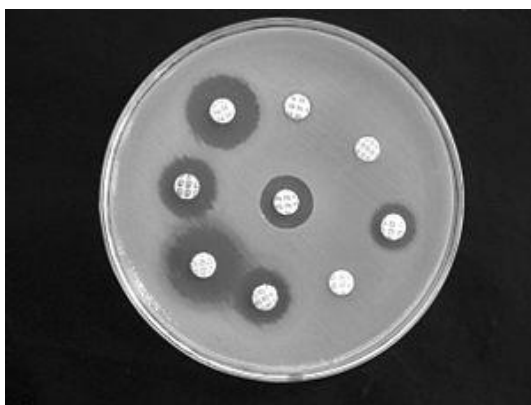
Jde o metodu, ve které dochází ke smíchání naředěného antibiotika s tekutým bujónem. Připravené roztoky se poté dávkuje do mikrotitračních destiček. V případě růstu bakterie dojde ke vzniku zákalu, který při inhibici mizí. Po určité inkubační době se jako hodnota MIC hodnotí nejnížší koncentrace antimikrobní látky, kde není patrný růst mikroorganismu. Hodnocení se uskutečňuje buď vizuálně, pomocí turbidického stanovení či měření absorbance [31–32].

2.4.2 Kvalitativní – difúzní metody

Jedná se o metody, které jsou založeny na difúzi antimikrobiálních látek ze zdroje do okolí. Tento přechod způsobí klesající koncentrační gradient, který brání růstu mikroorganismu do určité vzdálenosti (vznik tzv. inhibiční zóny). Díky těmto metodám určíme buď citlivost, nebo rezistenci bakterie k danému antibiotiku. Do této skupiny metod náleží například disková difúzní metoda nebo agarová difúzní metoda [31–32].

2.4.2.1 Disková difúzní metoda

Tato metoda se používá zejména pro vyšetření citlivosti u rychle rostoucích bakterií. Hodnocení se zakládá na tom, že se změří velikost inhibičních zón vzniklých kolem disků s určitou koncentrací antimikrobiální látky [31–32].



Obrázek 4: Disková difúzní metoda [33]

2.4.2.2 E-test

E-test je gradientová metoda kombinující principy diskové difúzní a agarové diluční metody. Tato metoda nám poskytne informaci o tom, jakou koncentraci antibiotika použít, aby byla účinná proti testovanému kmenu bakterie nebo kvasinky, či plísni. Využívá se k tomu speciální proužek napuštěný zvyšující se koncentrací antibiotika, obsahujícího stupnici, ze které se odečte hodnota MIC [34].



Obrázek 5: E – test [35]

2.5 Mikroorganismy

Volba vhodného mikroorganismu je pro studium antimikrobiálních vlastností nepostradatelnou podmínkou. Mikroorganismus je jednobuněčný organismus, jehož buňky jsou pozorovatelné mikroskopicky. Při pomnožení mohou tvořit na povrchu film, jehož zákal můžeme pozorovat pouhým okem. Mezi mikroorganismy se řadí převážně prokaryota (bakterie), ale také kvasinky nebo plísň [38].

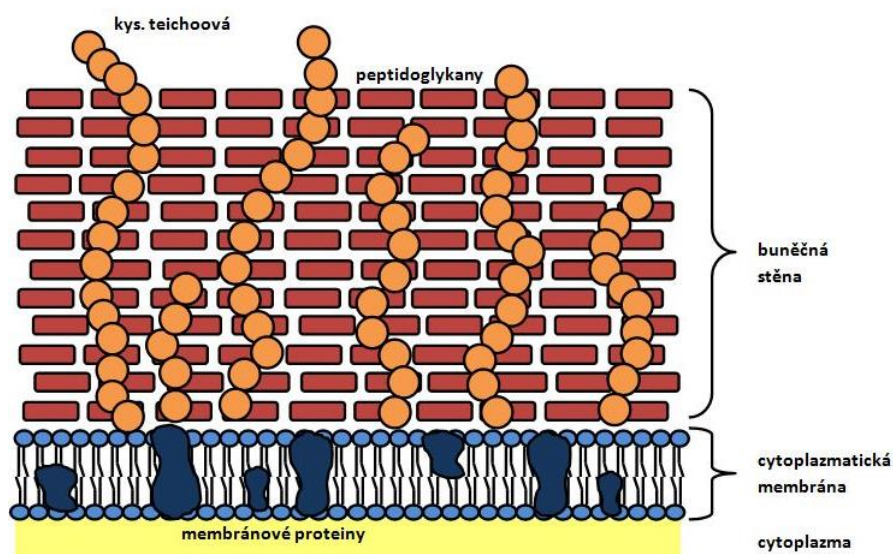
Důležitým rozdílem mezi prokaryoty a většinou eukaryot je přítomnost buněčné stěny s ochrannou funkcí, která se nalézá vně cytoplazmatické membrány. Gramovo barvení dalo základ rozdělení bakterií na Gram pozitivní (G+) a Gram negativní (G–). Toto dělení je založeno na různé stavbě bakteriální stěny [36–37].

2.5.1 Buněčná stěna Gram pozitivních bakterií

Buněčné stěny Gram pozitivních bakterií se strukturně liší od buněčných stěn Gram negativních bakterií. U Gram pozitivních bakterií tvoří buněčnou stěnu peptidoglykan a polysacharidy, kterými prochází kyselina teichoová. Peptidoglykan je makromolekula složená z cukrů a aminokyselin, které jsou sestaveny strukturně jako tkaný materiál. Amino-cukerná složka sestává ze střídajících se molekul N-acetylglukosaminu (NAG) a kyseliny N-acetylmuramové (NAM) [36–38].

Tyto molekuly jsou zesíťovány krátkými peptidy, které pomáhají poskytovat peptidoglykanovou sílu a strukturu. Peptidoglykan poskytuje ochranu bakteriím a definuje jejich tvar. Silné vrstvy také umožňují Gram pozitivním bakteriím během barvení Gramem zadržet většinu krystalově fialového barviva, což způsobuje, že se objevuje fialové zabarvení [36].

Gram +



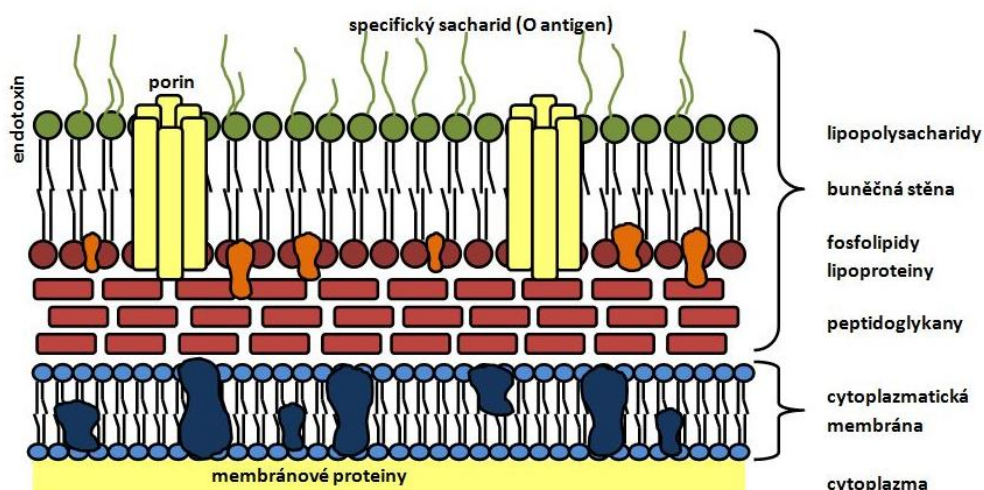
Obrázek 6: Buněčná stěna Gram pozitivních bakterií [39]

2.5.2 Buněčná stěna Gram negativních bakterií

Podobně jako u Gram pozitivních bakterií, i Gram negativní bakteriální buněčná stěna je složena z peptidoglykanu. Peptidoglykan je však jediná tenká vrstva ve srovnání s tlustými vrstvami v Gram pozitivních buňkách. Tato tenká vrstva nezachovává počáteční krystalové violetové barvivo, ale během barvení Gramem zachycuje růžové zbarvení kontrastního barviva [36–37].

Vnější membrána poskytuje buňce protichemickou ochranu. Propouští živiny a chrání buňku před lytickými účinky žlučových kyselin, enzymů, lysozymu, penicilinu. Činí Gram negativní buňku chemicky odolnější než buňku Gram pozitivní [38].

Gram -



Obrázek 7: Buněčná stěna Gram negativních bakterií [40]

2.5.3 Kultivace mikroorganismů

Pro kultivaci mikroorganismů v laboratorních podmínkách je nutné přenést studovaný mikroorganismus do sterilního živného prostředí, aby se zabránilo jeho kontaminaci organismy přítomnými v prostředí. Připravovaná živná media musí být izotonická, musí obsahovat zdroj uhlíku a dusíku v koncentraci a formě optimální pro kultivovaný organismus, potřebné růstové faktory a dostatek vody. Optimální živné prostředí by v průběhu kultivace nemělo měnit své fyzikální a chemické vlastnosti [41].

2.6 Imobilizace enzymů

Imobilizací enzymu se rozumí zavedení enzymu do materiálu, který zabrání uniknutí enzymu ven a umožní průchod produktů, substrátů či kofaktorů. Tento materiál by měl splňovat určité požadavky závislé na typu enzymu, měl by být netoxický, nedegradovatelný a biokompatibilní [42].

2.6.1 Enkapsulace aktivních látek

Enkapsulace patří mezi jednu z technik imobilizace aktivních látek. Jedná se o zachycení jedné látky uvnitř druhé látky, kdy vzniká částice tvořená jádrem s aktivní látkou a vnějším obalem. Své uplatnění nachází tato technika v kosmetickém, farmaceutickém i potravinářském průmyslu [43].

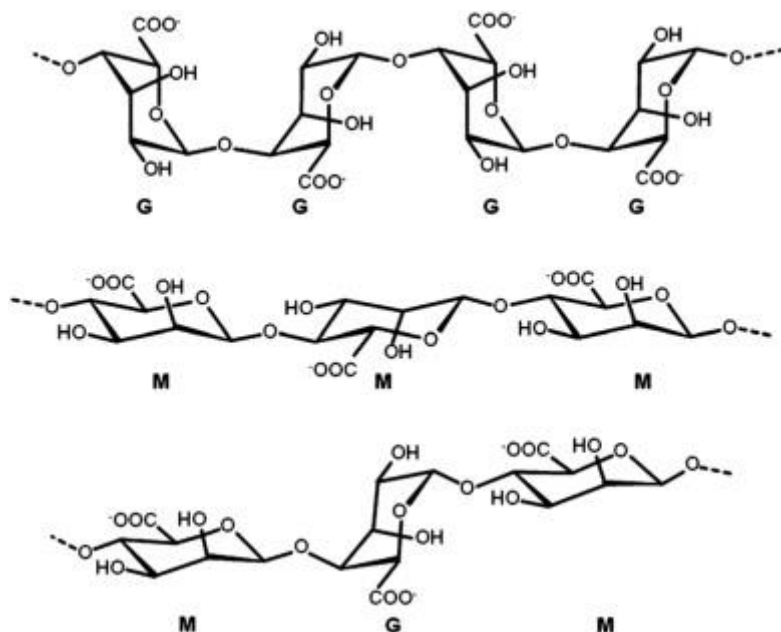
Důvodů proč enkapsulovat je mnoho, mezi ty nejdůležitější patří možnost ochránit materiál před degradací, zpomalení rychlosti odpařování nebo přenosu aktivní složky do vnějšího prostředí, zdokonalení vizuálního aspektu zapouzdřeného produktu, upravení fyzikálních vlastností materiálu, dosažení řízeného nebo cíleného uvolňování účinných látek (produkt může být uvolněn buď v určitý čas nebo v určitém bodě), zlepšení skladovatelnosti zabraňující degradačním reakcím (dehydratace, oxidace atd.), maskování chuti nebo pachů aktivní složky nebo míchání nekompatibilních sloučenin oddělením složek ve směsi, která by spolu navzájem reagovala [43].

2.7 Nosiče pro imobilizaci enzymů

2.7.1 Alginát

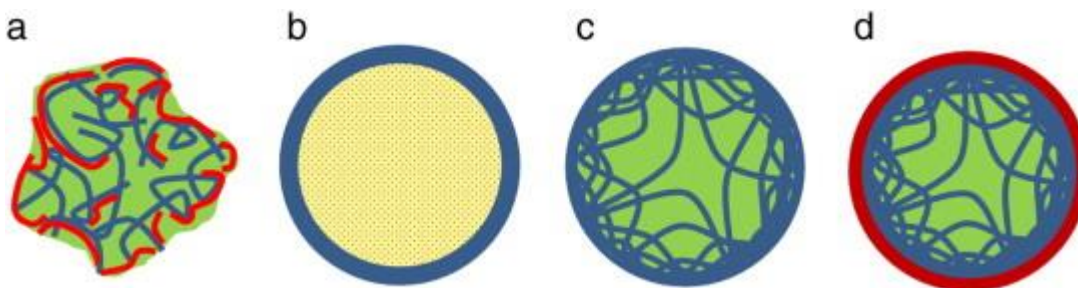
Alginát je snadno dostupný, netoxický, biologicky rozložitelný aniontový polymer. Je produkován hnědými řasami a bakteriemi. Skládá se ze zbytků kyseliny α -1-guluronové (G) a kyseliny β -D-mannuronové (M), které jsou lineárně spojené 1,4-glykosidickými vazbami [42].

Při výrobě alginátového nosiče se využívá zesítujícího činidla, jako je chlorid vápenatý nebo chlorid barnatý. Vlastnosti gelů závisí na typu zesítení, hustotě zesítení a molekulové hmotnosti a složení alginátu [42, 44].



Obrázek 8: Chemické struktury alginátu [44]

Alginát je také využíván pro tvorbu nanočástic. Ať už se jedná o nanoagregáty, nanokapsle či nanosféry, tyto systémy udržují enzymy či jiné sloučeniny připojené k matici částic. Tvorba nanočástic je založena na dvou metodách. První metodou je komplexace, kde komplex ve vodném prostředí tvoří nano-agregáty a na olejovém rozhraní nanokapsle. Druhou metodou je emulgace alginátu v oleji za vzniku alginátových nanosfér [42, 44].



Obrázek 9: Nanoagregát (a), nanokapsle (b), nanosféry se strukturovaným vnitřkem (c) a nanokapsle se strukturovaným vnitřkem (d) [44].

2.7.2 Chitosan

Chitosan je dalším přírodním polymerem využívaným v imobilizačních technologiích. Rozpouští se pouze ve zředěné kyselině octové nebo kyselině chlorovodíkové. Byla navržena iontová komplexace chitosanu (majícího pozitivní náboj) s alginátem (majícím negativní náboj) za vzniku systému pro imobilizaci proteinů [42].

2.7.1 PHA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biologicky rozložitelné a kompatibilní polyestery. Díky svým jedinečným vlastnostem mají širokou škálu uplatnění. Pro své jedinečné vlastnosti jako

je biologická kompatibilita a rozložitelnost, jsou slibnými materiály pro medicínské využití. Produkty z PHA jsou také netoxické pro buňky a tkáně [45–46].

PHA jsou přirozeně produkovány mikroorganismy při nevyvážených růstových podmínkách, například mikroorganismy rodu *Pseudomonas* nebo *Cupriavidus*. Rozlišují se polymery s krátkým řetězcem, jakou je PHB (poly-3-hydroxybutyrát), a polymery s delším řetězcem, jako jsou například jeho kopolymery s hydroxyvalerátem (PHBV), nebo hydroxyhexanoátem (PHBH), které jsou tvrdší a odolnější [47].

Mezi potenciální aplikace PHA patří oblast tkáňového inženýrství, používají se pro regeneraci tkáně, jako zařízení pro opravu kloubní chrupavky, nervová vodítka, zařízení pro opravu šlach, implantáty okulárních buněk, klece míchy páteře, náhražky kůže, obvazy na rány, hemostaty atd. [48].

2.8 Liposomy

Liposomy jsou rozsáhle využívanými systémy pro cílenou dopravu léčiv. Jsou to malé, netoxické a biologicky rozložitelné vektory složené z lipofilní fosfolipidové dvojvrstvy a hydrofilního vnitřního jádra. Díky své specifické struktuře mohou liposomy transportovat jak hydrofilní, tak hydrofobní farmaceutická léčiva. Dodávání léčiv liposomy zvyšuje jejich terapeutický index a mění jejich profil biologické distribuce. Mezi jejich výhody patří například pasivní cílení prostřednictvím zvýšené propustnosti a retenčního účinku, schopnost řídit uvolňování léčiva, snížení vedlejšího účinku a zlepšení stability léčiv [49–52].

Liposomy však mají také nevýhody, které omezují jejich klinické aplikace, jako jsou nedostatečné mechanické vlastnosti a neschopnost udržet určitou koncentraci léčiva v místní oblasti. Zlepšení vlastností lze dosáhnout různými modifikacemi povrchů liposomů [49–52].

2.9 Charakterizace částic

2.9.1 Stanovení stability částic

Metoda elektroforetického rozptylu světla měří, jak rychle se částice pohybuje v kapalině, když se aplikuje elektrické pole. Jakmile známe rychlost částice a aplikované elektrické pole, můžeme s použitím dvou dalších známých konstant vzorku – viskozity a dielektrické konstanty – vypočítat potenciál zeta. Pokud má systém dostatečně kladný anebo dostatečně záporný zeta potenciál, je pak elektrostaticky stabilní (∞ , +30 mV) anebo naopak (-30 , ∞) [53].

2.9.2 Stanovení velikosti částic

Velikost částic se určuje pomocí dynamického rozptylu světla. Tato metoda měří Brownův pohyb částic a přiřazuje ho k velikostem částic. Brownův pohyb je definován jako: "Náhodný pohyb částic v kapalině způsobený jejich bombardováním molekulami, které je obklopují". Malé částice se pohybují rychle, zatímco velké pomaleji. Jako zdroj světla se k měření využívá laser, který prochází přímo přes vzorek umístěný. Brownův pohyb ovlivňuje všechny disperzní systémy, jejichž částice spadají do tzv. submikronové oblasti [54].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla příprava antimikrobiálních gelů a krytů s obsahem antimikrobiálních složek a enzymů. V rámci práce byly řešeny následující dílčí cíle:

1. rešerše – antimikrobiální látky, jejich struktura; enzymy s antimikrobiálním účinkem
2. příprava nanomateriálů s antimikrobiálním účinkem
3. příprava a charakterizace antimikrobiálních gelů a krytů s obsahem antimikrobiálních složek a enzymů

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité ke spektrometrickým stanovením

- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)
- Uhličitan sodný bezvodý, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)
- Ethanol pro UV/VIS 99 %, Lach-Ner (ČR)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina trichloroctová, Lach-Ner (ČR)
- Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)
- Chlorid hlinitý, Lach-ner (ČR)
- Dusitan sodný, Lach-ner (ČR)
- ABTS, Sigma-Aldrich (SRN)
- Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.2 Chemikálie použité na přípravu částic

- Lecithin, Sigma-Aldrich (SRN)
- Cholesterol, Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.3 Chemikálie použité na přípravu krytů

- Chloroform, Lach-Ner (ČR)
- Polyhydroxybutyrát, Biomer (SRN)
- Alginát sodný, Sigma Aldrich (UK)
- Chitosan, Sigma Aldrich (UK)
- Trifosfát sodný, Sigma Aldrich (UK)
- Chlorid vápenatý, Lachema (ČR)
- Lysozym, Sigma-Aldrich (UK)
- Bromelain, Serva (SRN)
- Kyselina octová, Lach.Ner (ČR)

4.1.4 Chemikálie použité na kultivaci mikroorganismů

- Nutrient Broth Medium (NB), Himedia (India)
- Yeast Extract Powder, Himedia (India)
- D-glukóza bezvodná, Lachner (ČR)
- Pepton aus Casein, Himedia (India)
- Agar, Himedia (India)

4.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco (SRN)
- Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)
- Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
- Centrifuga, Sartorius, Biotech (ČR)
- Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)
- ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)
- Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor – Bandelin Sonoplus HS3200 – Sonorex Technik (SRN)
- Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (UK)
- Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (DE), Biohit (SRN)
- Rotační zvlákňovací přístroj
- CellCulture CO₂ Inkubátor, ESCO (SRN)
- Laminátový box Aura mini – Bioair, EuroClon (IT)
- DLS analyzátor Zetasizer Nano ZS, Malvern (UK)

4.3 Použité mikroorganismy

V této práci byly použity bakteriální kultury, které pocházejí z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

- *Candida glabrata* (CCM 8270)
- *Micrococcus luteus* (CCM 1569)
- *Serratia marcescens* (CCM 8587)

4.4 Použité přírodní materiály

- Skořice mletá (Vitana)
- Hřebíček (Vitana)
- Hřebíčková silice (Fichema)



Obrázek 10: Použité materiály

4.5 Příprava extraktů

Z vybraných materiálů byly připraveny různé typy extraktů, konkrétně extrakty vodné a ethanolové v odlišném procentuálním zastoupení.

Na přípravu vodných extraktů byl použit vždy 1 g vzorku, který byl extrahován 10 ml destilované vody. Tento postup byl opakován také při přípravě 20 %, 40 %, 60 %, 80 % a 96 % ethanolového extraktu.

Poté byly vzorky louhovány po dobu 24 hodin na třepací plošině vyhřívané na teplotu 37 °C. Následně byly vzorky zcentrifugovány po dobu 10 minut při otáčkách 9 000 RPM. Supernatant byl převeden do čisté centrifugační zkumavky a uchováván při teplotě 7 °C.

4.6 Charakterizace aktivních látek

4.6.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Stanovení obsahu polyfenolických látek je založeno na reakci vzorku s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Tato reakce se projeví modrým zbarvením roztoku, který můžeme spektrofotometricky sledovat. Jako standard byla použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí 0,087 5 – 0,7 mg/ml.

K 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného vodou v poměru 1:9 byl přidán 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Obsah zkumavky byl promíchán. Po 5 minutách stání byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a obsah zkumavky byl opět promíchán a ponechán 15 minut stát. Poté byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 750 nm proti blanku, kde místo vzorku byla přidána voda.

4.6.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Stanovení obsahu flavonoidů se provádí spektrofotometrickou metodou založenou na reakci hlinité soli s dusitanem. Jako kalibrační roztok byl použit roztok katechinu v ethanolu v koncentračním rozmezí 0,06 – 0,3 mg/ml.

K 0,5 ml vzorku byl přidán 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5 % roztok dusitanu sodného. Obsah ve zkumavce byl promíchán a nechán 5 minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% roztok chloridu hlinitého, obsah byl opět promíchán a nechán 5 minut stát. Bylo přidáno 1,5 ml 1 M hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti blanku.

4.6.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla stanovena za pomoci roztoku ABTS^{•+}. Roztok ABTS byl rozpuštěný v destilované vodě na koncentraci 7 mmol/l. Tento radikálový ion ABTS^{•+} byl získán reakcí s 2,45 mmol/l peroxodisíranem draselným. Poté byl roztok ponechán při laboratorní teplotě ve tmě nejméně 12 hodin. Před použitím byl roztok ABTS^{•+} naředěn ethanolem na absorbanci $A = 0,700 \pm 0,020$ při vlnové délce 734 nm proti ethanolu.

Do zúžené kyvety byl při stanovování antioxidační aktivity vzorků napipetován 1 ml $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a bylo přidáno 10 μl vzorku, poté byl zaznamenán pokles absorbance v 10. minutě. Jako blank byl použit 1 ml $\text{ABTS}^{\cdot+}$, ke kterému bylo přidáno 10 μl destilované vody. Pro stanovení kalibrační závislosti byl jako standard použit roztok Troloxu v koncentračním rozmezí 50 – 400 $\mu\text{g/ml}$.

4.7 Příprava liposomových částic

K 10 ml destilované vody bylo přidáno 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu. Připravený roztok byl ultrazvukován pomocí sondového ultrazvuku. Stejným postupem byly připraveny částice s přídavkem 1 ml extraktu. Část připraveného vzorku byla použita ke stanovení enkapsulační účinnosti a část připravených liposomových částic byla využita k antimikrobiálním testům.

4.8 Charakterizace liposomových částic

U připravených liposomových částic byla stanovena jejich enkapsulační účinnost, velikost a stabilita.

4.8.1 Stanovení velikosti a stability liposomových částic

Roztok liposomových částic byl analyzován pomocí přístroje Malvern Zetasizer ZS. Tento přístroj nám proměřil distribuci velikosti částic, průměrnou velikost částic a zeta potenciál, díky kterému jsme mohli zjistit stabilitu částic.

4.8.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Po enkapsulaci byl roztok liposomových částic zcentrifugován po dobu 60 minut při 14 000 RPM. Následně byl v supernatantu stanoven celkový obsah fenolických látek. Pro stanovení enkapsulační účinnosti byla stanovena koncentrace fenolických látek v supernatantu a v roztoku extraktu před enkapsulací. Porovnáním těchto dvou hodnot se zjistilo množství enkapsulovaných fenolických látek do liposomových částic.

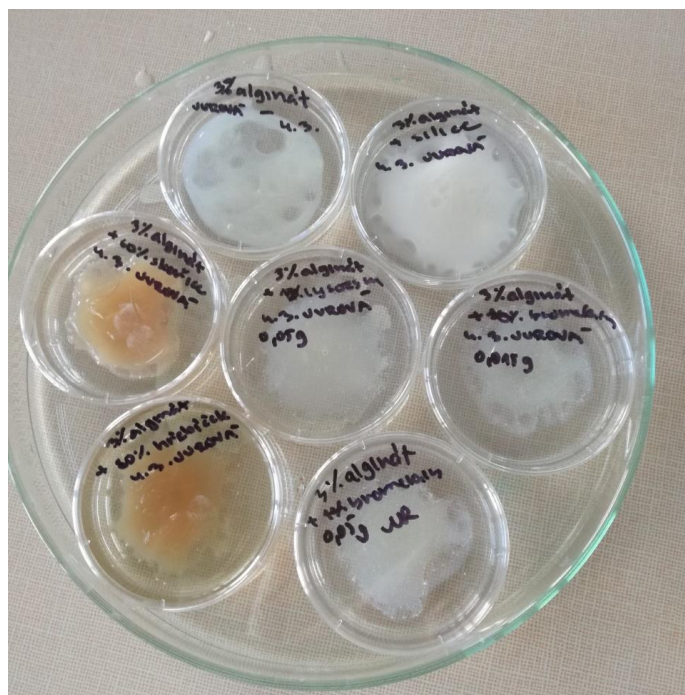
4.9 Příprava xanthanových gelů

Pro budoucí aplikace a stanovení antimikrobiálního účinku byly připraveny hydrogely. Pro přípravu byla použita 1 % xanthanová guma s přídavkem hřebíčkového extraktu, skořicového extraktu, hřebíčkové silice, bromelainu a lysozymu.

4.10 Příprava nevláknenných krytů

Pro přípravu nevláknenných krytů byl použit roztok alginátu sodného a chitosanu. Jako síťovací činidlo byl pro alginát použit roztok chloridu vápenatého. V případě chitosanu byl k zesíťování použit roztok trifosfátu sodného. Ze zásobních roztoků byly připraveny roztoky o koncentraci 1, 2 a 3 %. Tyto roztoky alginátu sodného a chitosanu byly nality, v množství 5 ml, do malých Petriho misek. Tato vrstva byla poté přelita stejným množstvím síťovacích roztoků o stejné koncentraci, jako měl roztok alginátu sodného nebo chitosanu.

Tímto postupem byly připraveny kryty s přidavkem hřebíčkového extraktu, skořicového extraktu, hřebíčkové silice, bromelainu a lysozymu. Takto vytvořené kryty byly v Petriho miskách uchovány v chladu.



Obrázek 11: Připravené nevlákněné kryty

4.11 Antimikrobiální testy

Pro sledování antimikrobiální aktivity byly vybrány 3 kmeny mikroorganismů: grampozitivní *Micrococcus luteus*, gramnegativní *Serratia marcescens* a kvasinka *Candida glabrata*.

4.11.1 Příprava médií

Pro jednotlivé kmeny byla nejdříve zvolena vhodná média (Tabulka 1). Tato média byla poté řádně zamíchána a sterilizována v tlakovém hrnci.

Tabulka 1: Látky použité na přípravu média

Mikroorganismus	Médium	Množství na 1 l
bakterie	Agar	20 g
	Nutrient Broth	25 g
kvasinka	Yeast extract powder	10 g
	Pepton aus Casein	20 g
	D-glucose anhydrous	20 g
	Agar	20 g

4.11.2 Kultivace mikroorganismů

Stěrem kličkou z pevného média nebo napipetováním kultury byly mikroorganismy přeočkovány do 50 ml tekutého média. Mikroorganismy byly po zaočkování kultivovány v inkubačním boxu s třepáním po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.



Obrázek 12: Připravená média

4.11.3 Bujónová diluční metoda

U připravených extraktů, částic, xanthanových gelů a nevláknenných alginátových krytů s extrakty byla měřena jejich antimikrobiální účinnost pomocí změny zákalu, kterou způsobuje růst mikroorganismů. Měření bylo prováděno pomocí přístroje ELISA Reader na 96 a 24 jamkové mikrotitrační destičce.

Do 96 jamkových destiček bylo napipetováno po 150 μ l vhodně naředěné buněčné kultury a 50 μ l vzorku. Jako blank se použily jamky naplněné 150 μ l buněčné kultury s 50 μ l destilované sterilní vody. Extrakty, částice a gely byly testovány v 96 jamkové destičce, zatímco kryty ve 24 jamkové. Do 24 jamkových destiček bylo napipetováno po 2 ml vhodně naředěné kultury, ke kterým byly přidány předem zvážené kousky nevláknenných krytů. Změna zákalu byla měřena pomocí ELISA Readeru v čase 0 a znovu po 24 hodinách.

Antimikrobiální účinek jednotlivých vzorků byl vyhodnocován jako viabilita buněk. Každý vzorek byl naměřený třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Absorbance po 24 hodinách byla odečtena od času 0 a porovnána s blankem. Viabilita buněk byla následně vyhodnocena v procentech.

4.12 Příprava nanovláknenných krytů na bázi PHB

Nanovláknna z PHB byla připravena metodou zvanou forcespinning. Zásobní roztok PHB byl připraven rozpuštěním navážky PHB v chloroformu a následným zahříváním za stálého míchání na magnetické míchačce. Pro tuto metodu byl zvolen roztok PHB o koncentraci 4 %.

4.12.1 Metoda forcespinning

Tato metoda využívá ke zvlákňování odstředivé síly. Roztok PHB se pomalu přikapává do středu přístroje, vytvořená vlákna se zachytávají na kolektorové tyče, ze kterých se následně opatrně sundávají. Takto vytvořená vlákna byla poté uchována v suchu a ve tmě. Dále byla stejným postupem vytvořena vlákna s 5 %, 10 % a 20 % obsahem hřebíčkové silice do roztoku PHB s chloroformem. U připravených vláken byla testována jejich antioxidační aktivita.

4.13 Antioxidační aktivita nanovláknenných krytů

Ze všech typů připravených vláken byl vystřižnutý čtverec o rozměru cca 1 cm². Tyto vzniklé čtverce nevláknenných krytů byly následně zváženy. Do zkumavky byly napipetovány 2 ml roztoku ABTS, do kterého bylo vlákno ponořené. Po uplynutí 10 minut byl zaznamenán pokles absorbance podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.3.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

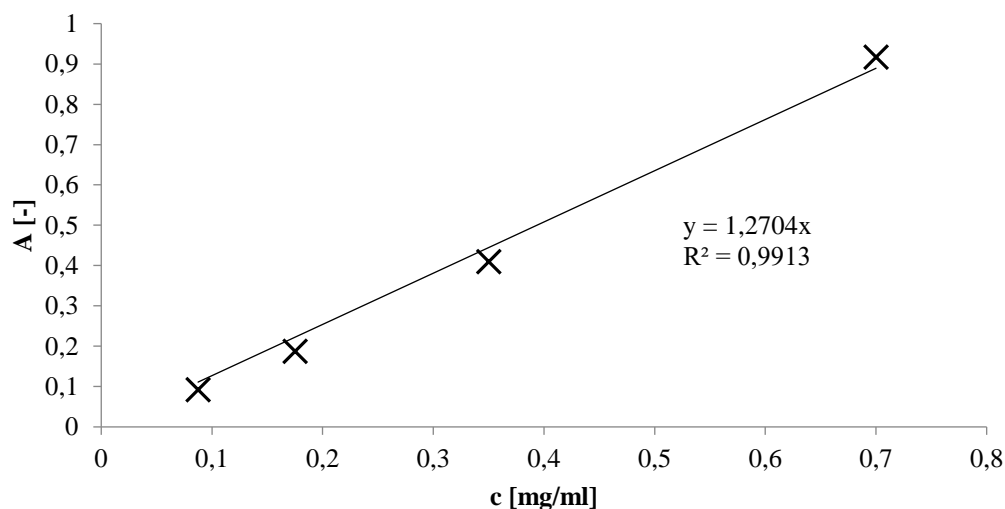
Tato bakalářská práce byla zaměřena na testování antimikrobiálních vlastností aktivních látek vodných a ethanolových extraktů skořice a hřebíčku. U připravených extraktů byla stanovena celkový obsah fenolických látek a flavonoidů. Následně byly z těchto extraktů připraveny liposomové částice, u kterých byla určena velikost, stabilita a enkapsulační účinnost. Dále byly připraveny hydrogely na bázi xanthanu a byla optimalizována příprava nevláknenných krytů na bázi alginátu, chitosanu a vláknenných krytů na bázi PHB. V závěru byly připravené materiály podrobeny antimikrobiálním testům vůči kvasinkám, gram pozitivním i gram negativním bakteriím. U vláken byla testována jejich antioxidační aktivita.

5.1 Charakterizace extraktů

Extrakty byly připraveny dle postupu popsaného v kapitole 4.5. Všechny připravené extrakty byly charakterizovány z hlediska celkového obsahu fenolických látek a celkového obsahu flavonoidů.

5.1.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Obsah fenolických látek byl stanoven podle postupu popsaného v kapitole 4.6.1. Koncentrace fenolických látek byla vypočtena pomocí sestavené kalibrační křivky kyseliny gallové (Obrázek 13) z lineární regrese kalibrační závislosti.



Obrázek 13: Kalibrační závislost pro stanovení celkových fenolických látek

Každý extrakt byl analyzován třikrát a výsledkem byla průměrná hodnota z těchto měření. Celkový obsah fenolických látek byl vypočítáván v mg fenolických látek na 1 g suchého vzorku. V tabulce 2 jsou uvedeny získané výsledky koncentrací fenolických látek v extraktech.

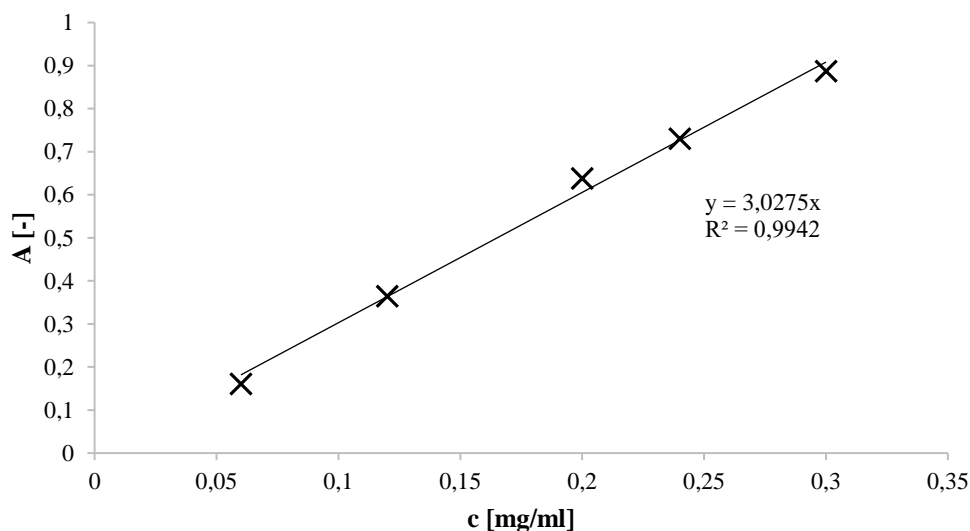
Tabulka 2: Výsledné celkové obsahy fenolických látek v extraktech

procento zastoupení ethanolu v extraktu	c [mg/g]	
	hřebíček	skořice
0 %	10,97 ± 0,98	2,06 ± 0,08
20 %	19,31 ± 2,33	4,12 ± 0,69
40 %	27,87 ± 3,31	5,42 ± 0,68
60 %	33,80 ± 2,07	5,65 ± 0,30
80 %	31,91 ± 0,83	5,68 ± 0,31
96 %	27,50 ± 4,05	4,74 ± 0,28

Ze získaných výsledků je patrné, že hřebíčkové extrakty obsahují mnohem víc fenolických látek než extrakty ze skořice. Nejvyšší koncentraci z hřebíčkových extraktů obsahoval vzorek, který k extrakci využíval 60 % ethanol, a to $33,80 \pm 2,07$ mg/g fenolických látek. Ze skořicových extraktů to byl extrakt s 80 % ethanolu, tento vzorek obsahoval $5,68 \pm 0,31$ mg/g fenolických látek. Nejmenší obsah fenolických látek byl naopak zjištěn u vodného extraktu skořice, $2,06 \pm 0,08$ mg/g. Obsah fenolických látek byl tedy u obou vzorků závislý na obsahu ethanolu, nejlépe na tom byly vzorky, které obsahovaly ethanol v rozmezí 60-80 %.

5.1.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Obsah flavonoidů byl změřen pomocí postupu popsaného v bodě 4.6.2. Koncentrace flavonoidů byla vypočtena pomocí sestavené kalibrační křivky katechinu (Obrázek 14) z lineární regrese kalibrační závislosti.



Obrázek 14: Kalibrační závislost pro stanovení celkových flavonoidů

Stejně jako u stanovení celkových fenolických látek byl každý extrakt analyzován třikrát a výsledkem byla průměrná hodnota z těchto měření. Celkový obsah flavonoidů byl

vypočítáván v mg flavonoidů na 1 g suchého vzorku. V tabulce 3 jsou uvedeny získané výsledky koncentrací flavonoidů v extraktech.

Tabulka 3: Výsledné celkového obsahu flavonoidů v extraktech

procento zastoupení ethanolu v extraktu	c [mg/g]	
	hřebíček	skořice
0 %	1,72 ± 0,06	1,43 ± 0,41
20 %	1,91 ± 0,03	3,01 ± 0,34
40 %	2,39 ± 0,21	5,34 ± 0,21
60 %	2,27 ± 0,27	5,19 ± 0,38
80 %	2,40 ± 0,06	4,64 ± 0,30
96 %	2,82 ± 0,22	4,31 ± 0,27

Z tabulky lze říct, že skořicové extrakty obsahovaly větší množství flavonoidů než extrakty hřebíčkové. Nejmenší obsah flavonoidů obsahoval opět vodný extrakt skořice, $1,43 \pm 0,41$ mg/g. Největší množství bylo stanoveno u skořicového extraktu s obsahem 40 % ethanolu, a to $5,34 \pm 0,21$ mg/g. Z hřebíčkových extraktů to byl vzorek s 96 % ethanolu ($2,82 \pm 0,22$ mg/g).

Z předešlých dvou měření můžeme srovnat obsah flavonoidů a celkových fenolů. Hřebíčkové extrakty obsahovaly jen přibližně 10 % flavonoidů, zbytek byly jiné fenolické látky. Naopak skořicové extrakty měly prakticky 100 % flavonoidů a jiné fenoly v nich při porovnání s celkovými fenoly skoro nebyly.

5.2 Charakterizace liposomových částic

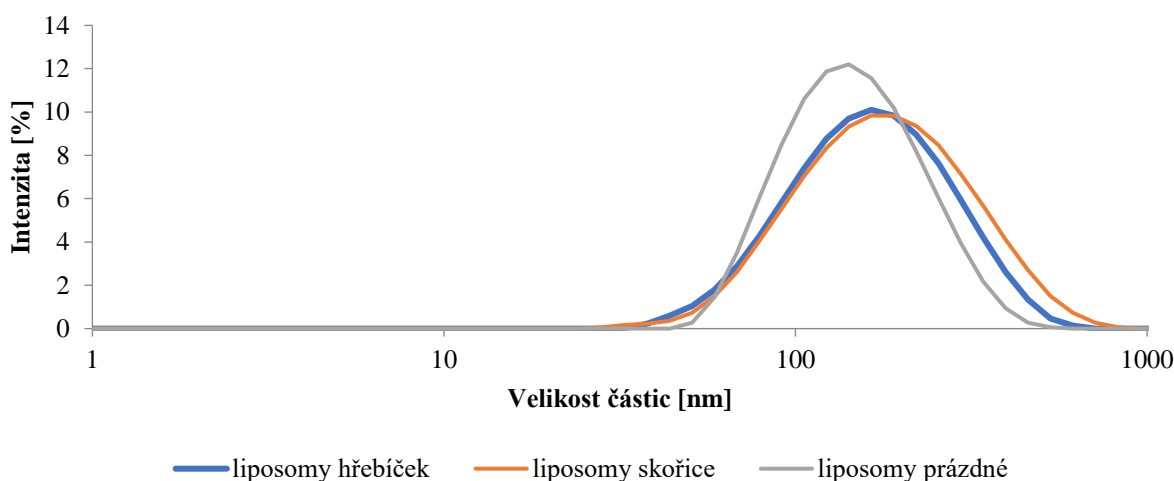
Podle postupu uvedeného v kapitole 4.7 byly připraveny liposomové částice. Liposomy byly připraveny ze skořicového extraktu, obsahujícího 60 % ethanolu, a hřebíčkového extraktu, obsahujícího 80 % ethanolu. Takto připravené částice byly charakterizovány z hlediska velikosti, stability a enkapsulační účinnosti.

5.2.1 Stanovení velikosti částic s enkapsulovanými extrakty

Velikost a distribuce velikosti byla určena na základě postupu uvedeného v kapitole 4.8.1. Měření bylo u částic provedeno ve třech opakováních a získané hodnoty byly zprůměrovány. Výsledné hodnoty polydisperzity a průměrná velikost částic jsou uvedeny v tabulce 4. Z průměrných velikostí byl také sestaven graf (Obrázek 15).

Tabulka 4: Průměrná velikost a intenzita distribuce velikosti částic s enkapsulovanými extrakty

Vzorek	Průměr částic [nm]	PdI [-]
liposomy	138,23 ± 2,12	0,21 ± 0,01
liposomy hřebíček	157,47 ± 2,84	0,31 ± 0,01
liposomy skořice	154,60 ± 2,10	0,24 ± 0,01



Obrázek 15: Stanovená velikost částic

Z výsledků je patrné, že průměrná velikost částic se po přidání extraktů mírně zvýšila. Liposomové částice s extraktem skořice ($154,60 \pm 2,10$ nm) měly skoro stejnou průměrnou velikost, jako liposomové částice s extraktem hřebíčku ($157,47 \pm 2,84$ nm).

5.2.2 Stanovení stability připravených částic

Stabilita liposomových částic byla stanovena dle postupu uvedeného v kapitole 4.8.1. Měření pomocí přístroje Zetasizer bylo provedeno třikrát a získané hodnoty byly zprůměrovány. Výsledné průměrné hodnoty zeta potenciálů jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Stabilita připravených částic

Vzorek	Zeta-potenciál [mV]
liposomy	$-30,33 \pm 2,49$
liposomy hřebíček	$-29,50 \pm 1,06$
liposomy skořice	$-33,30 \pm 0,61$

Prázdné liposomové částice a liposomové částice s extraktem skořice se dají považovat za velmi stabilní, neboť překonaly absolutní hodnotu zeta potenciálu 30 mV. Liposomové částice s přidavkem extraktu hřebíčku se ukázaly také jako stabilní, jelikož se k této hranici stability velmi přiblížily ($-29,50 \pm 1,06$ mV).

5.2.3 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena dle postupu uvedeného v kapitole 4.8.2. Hodnoty enkapsulovaného množství fenolických látek byly naměřeny třikrát. Z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Enkapsulační účinnost byla vyjádřena v procentech a zaznamenána v tabulce 6.

Tabulka 6: Vypočítané enkapsulované množství polyfenolů a enkapsulační účinnost

Extrakt	Obsah polyfenolů v roztoku		Enkapsulační účinnost [%]
	před enkapsulací	po enkapsulaci	
hřebíček	31,91 ± 0,83	24,69 ± 0,03	22,62
skořice	5,65 ± 0,30	3,85 ± 0,04	31,88

Z výsledků je jasné patrné, že enkapsulační účinnost je u obou extraktů poměrně nízká. Vyšší enkapsulační účinnost byla stanovena u extraktu ze skořice, a to 31,88 %. Extrakt z hřebíčku měl enkapsulační účinnost pouhých 22,62 %.

Aktivní látka je obsažena ve sférických útvech, které vznikly z připravené lipidové dvojvrstvy. Hlavním důvodem nízké enkapsulační účinnosti je přestup aktivní látky na základě koncentračního gradientu z tvořící se částice do roztoku. Degradace mohla být způsobena nedostatečnou pevností membrány obklopující daný liposom.

5.3 Příprava a optimalizace přípravy nevlákenných krytů

Nevlákné kryty byly připraveny podle postupu uvedeném v kapitole 4.10. Byly připravovány ze dvou materiálů, z alginátu a chitosanu. Koncentrace alginátu i chitosanu se pohybovaly v rozmezí 1–3 %. Do krytů byly následně přidávány aktivní látky. Byly připraveny kryty s přídavkem hřebíčkového extraktu, skořicového extraktu, hřebíčkové silice, bromelainu a lysozymu. Po optimalizaci byl jako nejvhodnější zvolen kryt z 3 % koncentrace alginátu.



Obrázek 16: Nevlákný kryt z 3 % alginátu

5.4 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální aktivita extraktů, liposomů, gelů a nevláknenných krytů byla testována na dvou kmenech bakterií – *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a kvasince *Candida glabrata*. Jako vhodný test byla zvolena bujónová diluční metoda. Postup antimikrobiálního testu pomocí diluční metody je popsán v kapitole 4.11.3. Tato metoda se provádí na tzv. mikrotitračních destičkách ve sterilním prostředí. Zpracování získaných dat bylo rozděleno na dvě části. V první části byly analyzovány účinky extraktů, částic a xanthanových gelů v 96 jamkové destičce, zatímco nevláknenné kryty byly testovány ve 24 jamkové. Ukázky vzorků v mikrotitračních destičkách jsou k vidění níže (Obrázky 17 a 18). Pro přehledné srovnání antimikrobiální aktivity byla vytvořena tabulka 7 a tabulka 8. Tyto tabulky shrnují účinky všech testovaných vzorků.

Tabulka 7: Shrnutí výsledků antimikrobiálních testů

	<i>M. luteus</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>C. glabrata</i>
extrakt skořice	++	+++	+
extrakt hřebíček	++	+++	+++
hřebíčková silice	+++	+++	+++
prázdné liposomy	+++	+	–
liposomy skořice	+	+	–
liposomy hřebíček	++	+++	+
samotný gel	+++	+	++
gel skořice	+	+++	+
gel hřebíček	+	+++	++
gel hřebíčková silice	+++	+++	+++
gel bromelain 1 %	++	–	–
gel bromelain 0,3 %	+	+	–
gel lysozym 1 %	++	+++	++

+++ viabilita pod 20 %; ++ viabilita mezi 20 a 50 %; + viabilita mezi 50 a 80 %; – viabilita nad 80 %

Všechny připravené vzorky extraktů, částic a gelů vykazovaly antibakteriální aktivitu proti bakteriálnímu kmeni *Micrococcus luteus*. Nejvyšší antimikrobiální účinnost k tomuto kmeni pak měly kryty s obsahem silice, prázdné liposomy, samotný gel a gel s hřebíčkovou silicí.

U rodu *Serratia marcescens* vykazoval minimální antibakteriální aktivitu pouze gel s obsahem 1 % bromelainu. Nejvyšší účinnost měly všechny připravené extrakty, liposomy s hřebíčkem, všechny gely s extrakty a gel s 1 % lysozymem.

Proti kvasinkovému kmeni *Candida glabrata* měl největší účinnost extrakt s přídavkem hřebíčku, hřebíčková silice a gel se silicí. Minimální aktivitu vykazovaly prázdné liposomy, liposomy se skořicí a gel s 1 % a 0,3 % bromelainem.

Nejlepších výsledků proti všem třem testovaným kmenům dosáhla hřebíčková silice, ať už ve formě samotného extraktu, tak také ve formě gelu. Buňky po působení hřebíčkové silice

měly viabilitu pouze pod 20 %. Nejnižší účinnost vykazovaly z obecného hlediska liposomy s přídatkem skořice a gely s obsahem bromelainu. Viabilita sahala v těchto případech až nad 50 %.

Tabulka 8: Shrnutí výsledků antimikrobiálních testů nevlákněných krytů

	<i>M. luteus</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>C. glabrata</i>
skořice	—	+	—
hřebíček	++	++	—
hřebíčková silice	+	++	+++
bromelain 1 %	—	—	—
bromelain 0,3 %	—	—	—
lysozym 1 %	—	++	—
lysozym 0,3 %	—	—	—

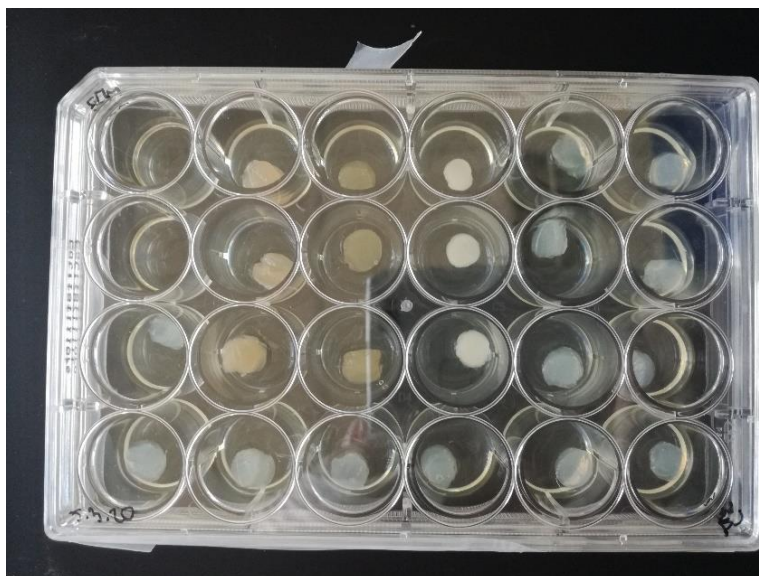
+++ viabilita pod 20 %; ++ viabilita mezi 20 a 50 %; + viabilita mezi 50 a 80 %; — viabilita nad 80 %

Stejným způsobem jako byly testovány účinky extraktů, částic a gelů, byly testovány i účinky nevlákněných krytů s obsahem aktivních látek. Antimikrobiální aktivita proti bakteriálnímu kmeni *Micrococcus luteus* byla téměř nulová. Viabilitu v rozmezí 20 až 50 % vykazovaly pouze buňky po působení krytu s obsahem extraktu z hřebíčku.

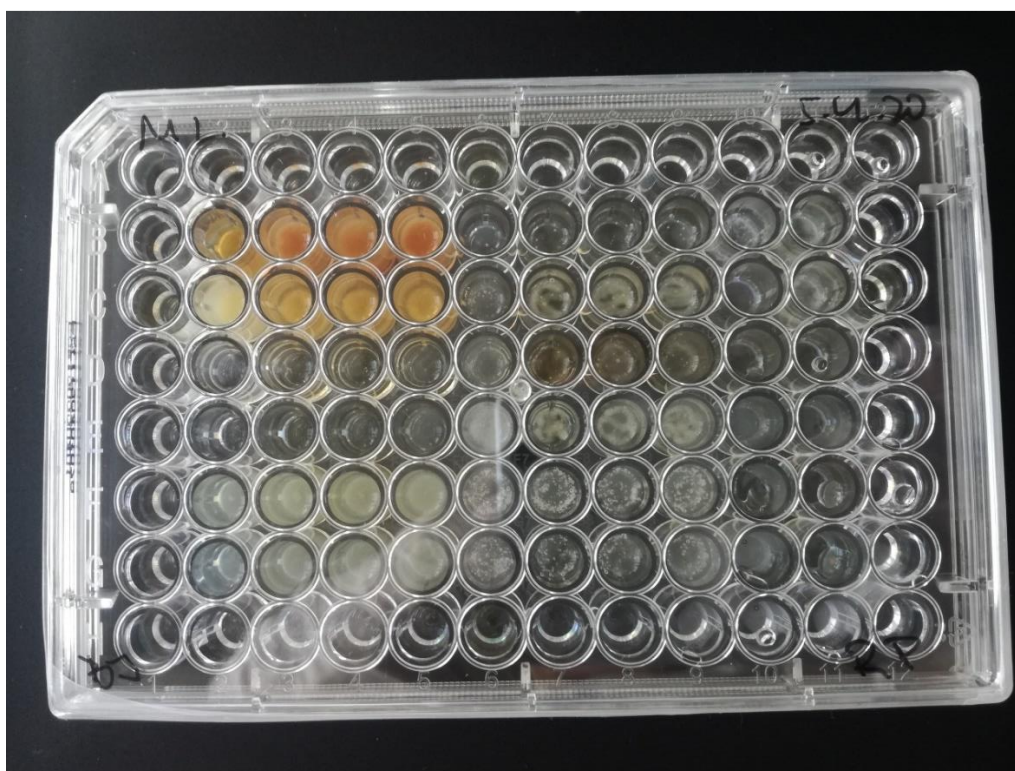
U kmene *Serratia marcescens* vykazovaly kryty nepatrně vyšší antibakteriální aktivitu, než tomu bylo u kmene předešlého. Viabilita v rozmezí 20 až 50 % byla stanovena u nevlákněného krytu s přídatkem hřebíčku, hřebíčkové silice a 1 % lysozymu.

Téměř žádná aktivita nebyla zjištěna proti kmeni *Candida glabrata*. Jediný kryt, který byl proti tomuto kmeni účinný, byl nevlákněný kryt s obsahem hřebíčkové silice. Buňky po působení tohoto krytu měly viabilitu pod 20 %.

Celkově lze říct, že nejlepších výsledků u antimikrobiálních testů nevlákněných krytů proti testovaným kmenům dosáhla hřebíčková silice. U nevlákněného krytu s hřebíčkovou silicí byla viabilita proti dvěma kmenům mezi 20 a 50 % a u jednoho mezi 50 a 80 %. Nevlákněné kryty s 1 % a 0,3 % bromelainem a s 0,3 % lysozymem vykazovaly proti všem třem testovaným kmenům téměř nulovou účinnost.



Obrázek 17: Mikrotitrační destička před zahájením antimikrobiálního testu krytů proti *Serratia marcescens*



Obrázek 18: Mikrotitrační destička před zahájením antimikrobiálního testu proti *Micrococcus luteus*

5.5 Příprava a optimalizace přípravy nanovláknenných krytů

Nanovláknenné kryty na bázi PHB byly připraveny metodou forcespinning na základě postupu uvedeného v kapitole 4.12. Jako nejvhodnější koncentrace PHB pro metodu forcespinning byla určena koncentrace 4 %. Z této optimalizované koncentrace PHB byla poté připravena nanovláknna s 5 %, 10 %, 20 % a 100 % přídavkem hřebíčkové silice. Při 100 % přídavku

hřebíčkové silice nevznikla pevná souvislá vlákna (Obrázek 19). U nanovláknenných krytů byla zkoumána jejich antioxidační aktivita.



Obrázek 19: Vláknina s přidavkem 100 % hřebíčkové silice



Obrázek 20: Příklad prázdného nanovláknenného krytu

5.6 Stanovení antioxidační aktivity nanovláknenných krytů

Antioxidační účinek vláken byl stanoven podle postupu uvedeného v kapitole 4.13. Hodnoty aktivity byly vztaženy na ekvivalent Troloxu v μg na g vzorku z vytvořené kalibrační závislosti, kde kalibrační rovnice byla $y = 0,0011x$. Všechny vzorky byly naměřeny třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Hodnoty antioxidační aktivity jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Antioxidační aktivita vláken a hřebíčkové silice

Vzorek	Antioxidační aktivita
5 % přidavek	$81,17 \pm 10,20 \mu\text{g}/\text{mg}$
10 % přidavek	$126,21 \pm 1,14 \mu\text{g}/\text{mg}$
20 % přidavek	$45,23 \pm 11,05 \mu\text{g}/\text{mg}$
hřebíčková silice	$137,05 \pm 5,46 \text{ mg}/\text{ml}$

Nejvyšší antioxidační aktivita u vláken byla naměřena u 10 % přidavku hřebíčkové silice, a to $126,21 \pm 1,14 \mu\text{g}/\text{mg}$. U 20 % přidavku, kde se dala čekat nejvyšší aktivita, byla antioxidační

aktivita naopak nejvyšší. To mohlo být zapříčiněno například tím, že koncentrace hřebíčkové silice již byla natolik vysoká, že ovlivnila vlastnosti roztoku a na vláknech zůstalo jen částečné množství přidané silice. Při 100 % přídavku hřebíčkové silice se změnila i vlastnosti vláken samotných a vlákna nešla z přístroje ani sundat. K porovnání byla naměřena i antioxidační aktivita samotné hřebíčkové silice, která činila $137,05 \pm 5,46$ mg/ml.

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací antimikrobiálních gelů a krytů s obsahem antimikrobiálních složek a enzymů. K testování antimikrobiální aktivity byl z rostlinných materiálů vybrán extrakt ze skořice, hřebíčku a hřebíčková silice. Ze zástupců enzymů s antimikrobiálním účinkem byl zvolen lysozym a bromelain.

Z hřebíčku a skořice byly připraveny extrakty vodné a ethanolové v odlišném procentuálním zastoupení. Všechny připravené extrakty byly charakterizovány z hlediska celkového obsahu fenolických látek a celkového obsahu flavonoidů. Nevyšší koncentraci fenolických látek měl z hřebíčkových extraktů vzorek, který obsahoval 60 % ethanolu ($33,80 \pm 2,07$ mg/g). Ze skořicových extraktů to byl extrakt s 80 % ethanolu ($5,68 \pm 0,31$ mg/g). Flavonoidů obsahoval nejvíce skořicový extrakt s obsahem 40 % ethanolu ($5,34 \pm 0,21$ mg/g). Z hřebíčkových extraktů to byl vzorek s 96 % ethanolu ($2,82 \pm 0,22$ mg/g).

Dále byly vybrané extrakty enkapsulovány do liposomů. Liposomy byly připraveny ze skořicového extraktu, obsahujícího 60 % ethanolu, a hřebíčkového extraktu, obsahujícího 80 % ethanolu. U připravených částic byla stanovena velikost, stabilita a enkapsulační účinnost. Liposomové částice s extraktem skořice ($154,60 \pm 2,10$ nm) měly podobnou průměrnou velikost, jako liposomové částice s extraktem hřebíčku ($157,47 \pm 2,84$ nm). Stabilita částic byla testována z hlediska zeta potenciálu. Liposomové částice s extraktem skořice byly považovány za velmi stabilní, neboť překonaly absolutní hodnotu zeta potenciálu 30 mV, Liposomové částice s přidavkem extraktu hřebíčku se ukázaly také jako stabilní, jelikož se k této hranici stability velmi přiblížily ($-29,50 \pm 1,06$ mV). Pro stanovení enkapsulační účinnosti byla stanovena koncentrace fenolických látek v roztoku před i po enkapsulaci. Enkapsulační účinnost byla u obou extraktů poměrně nízká. Vyšší enkapsulační účinnost byla stanovena u extraktu ze skořice, a to 31,88 %. Extrakt z hřebíčku měl enkapsulační účinnost pouze 22,62 %. Uvolnění aktivní látky do roztoku mohlo být způsobeno nedostatečnou pevností membrány obklopující liposomy a hydrofilitou extraktů, které měly tendenci zůstat ve vodném prostředí obklopující částice.

V další části práce byly připravovány nevláknenné kryty ze dvou materiálů, z alginátu a chitosanu. Po optimalizaci byl jako nejvhodnější kryt zvolen kryt s koncentrací alginátu 3 %. Do tohoto gelu byly následně přidány extrakty ze skořice, hřebíčku a hřebíčková silice. Dále byly pro stanovení antimikrobiálního účinku připraveny hydrogely. Pro přípravu byl použit 1 % roztok xanthanové gumy.

Na závěr byla testována antimikrobiální aktivita extraktů, gelů a liposomů pomocí bujónové diluční metody. Testy byly provedeny proti gram pozitivní bakterii *Micrococcus luteus*, gram negativní bakterii *Serratia marcescens* a kvasince *Candida glabrata*. Všechny připravené extrakty, gely a liposomy vykazovaly antibakteriální aktivitu proti bakteriálnímu kmeni *Micrococcus luteus*. Nejvyšší antimikrobiální účinnost k tomuto kmeni pak měly kryty s obsahem hřebíčkové silice. U rodu *Serratia marcescens* vykazovaly nejvyšší účinnost všechny připravené extrakty, liposomy s hřebíčkem, všechny gely s extrakty a gel s 1 % lysozymem. Proti kvasinkovému kmeni *Candida glabrata* měl největší účinnost extrakt s přidavkem hřebíčku, hřebíčková silice a gel se silicí. Z celkového hlediska při zkoumání

účinnosti proti všem testovaným kmenům dosáhla nejvyšší účinnosti hřebíčková silice, ať už ve formě samotného extraktu, nebo ve formě gelu. U testování nevlákenných krytů s obsahem aktivních látek byla hřebíčková silice také nejúčinnější. Ostatní látky přidané do nevlákenných krytů vykazovaly proti testovaným kmenům minimální antimikrobiální aktivitu.

U vláken byla testována jejich antioxidační aktivita. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u 10 % přídatku hřebíčkové silice, a to $126,21 \pm 1,14 \mu\text{g/mg}$. Při vyšších koncentracích silice docházelo k ovlivnění vlastností roztoku a vláken, a s vlákny se již nedalo nadále pracovat. Ke srovnání byla naměřena antioxidační aktivita samotné hřebíčkové silice, která činila $137,05 \pm 5,46 \text{ mg/ml}$.

Dále by se pro zlepšení účinku mohla zkoumat možnost kombinace vybraných aktivních složek a jejich postupné uvolňování. Praktické využití by nanovláknenné a nevláknenné kryty mohly najít například při léčbě kožních ran. Nanovláknenné kryty by napomáhaly při hojení uzavřených ran, zatímco nevláknenné kryty by udržovaly optimální prostředí v ránách otevřených. Antimikrobiální účinky gelů by se mohly také využít v různých výrobcích kosmetického průmyslu [55].

7 ZDROJE

1. CHAPMAN, James, Timothy SULLIVAN a Fiona REGAN. Nanoparticles in anti-microbial materials: use and characterisation. Cambridge, UK: Royal Society Chemistry, c2012. RSC nanoscience & nanotechnology, 23. ISBN 978-1-84973-159-1.
2. HERRERO, M., M. CASTRO-PUYANA, E. IBÁÑEZ a A. CIFUENTES. Compositional Analysis of Foods. Liquid Chromatography [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 295-317 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415806-1.00011-5. ISBN 9780124158061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158061000115>
3. BORRO, Bruno C., Randi NORDSTRÖM a Martin MALMSTEN. Microgels and hydrogels as delivery systems for antimicrobial peptides. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2020, 187 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.110835. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776520300655>
4. DA SILVA, Joas L., Shashank GUPTA, Kenneth N. OLIVIER a Adrian M. ZELAZNY. Antimicrobial peptides against drug resistant Mycobacterium abscessus. Research in Microbiology [online]. 2020 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/j.resmic.2020.03.001. ISSN 09232508. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250820300371>
5. EL MOGAHZY, Y.E. Finishing processes for fibrous assemblies in textile product design. Engineering Textiles [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 300-326 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1533/9781845695415.2.300. ISBN 9781845690489. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845690489500119>
6. STRYER. Biochemistry. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 1995, 1064 s.
7. Lock and key [online]. In: . [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25219166>
8. Inducedfit080 [online]. In: . [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Inducedfit080.png>
9. VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. Enzymologie. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
10. VELLARD, Michel. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. Current Opinion in Biotechnology. 2003, 14(4), 444-450. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00092-2. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166903000922>
11. VALLÉRY-RADOT, René. The life of pasteur. Garden City, New York: Garden City Publishing Co., [1930].
12. RAMANDEEP, Kaur a Singh Sekhon BHUPINDER. Enzymes as drugs: an overview. Journal of Pharmaceutical Education and Research [online]. 2012 [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <http://www.pcte.edu.in/jper/issues/2012-december-volume3-issue-2/paper-6.pdf>
13. MANCHENKO, Gennady P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1994. ISBN 978-0-8493-8935-1.
14. CALLEWAERT, Lien a Chris W. MICHIELS. Lysozymes in the animal kingdom. Journal of Biosciences [online]. 2010, 35(1), 127-160 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1007/s12038-

- 010-0015-5. ISSN 0250-5991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-010-0015-5>
15. CALLEWAERT, Lien a Chris W. MICHELIS. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* [online]. 2010, 35(1), 127-160 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1007/s12038-010-0015-5. ISSN 0250-5991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-010-0015-5>
 16. FLEMING, A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1922-05-01, roč. 93, č. 653, s. 306-317. ISSN 0962-8452. DOI: 10.1098/rspb.1922.0023. Dostupné z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1922.0023>
 17. RAU, Astrid. The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution. Jena, 2005. Dissertation. Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.
 18. VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.
 19. BERMUDER, O.; FORCINITI, D. Decontamination of surfaces by lysozyme encapsulated in reverse micelles. *Journal of Chromatography B*, 2004, 807, str. 95-103
 20. Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J. PROPERTIES AND APPLICATION OF EGG WHITE LYSOZYME AND ITS MODIFIED PREPARATIONS – a REVIEW. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008;58(1):5-10.
 21. RAWLINGS, Neil D. a G. SALVESEN. *Handbook of proteolytic enzymes*. Third edition. Amsterdam: Elsevier/AP, 2013. ISBN 9780124077423.
 22. OSTLIE, Daniel J., David JUANG, Pablo AGUAYO, et al. Topical silver sulfadiazine vs collagenase ointment for the treatment of partial thickness burns in children: a prospective randomized trial. *Journal of Pediatric Surgery* [online]. 2012, 47(6), 1204-1207 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.03.028. ISSN 00223468.
 23. OSTLIE, Daniel J., David JUANG, Pablo AGUAYO, et al. Overview of microbial therapeutic enzymes: a prospective randomized trial. *Journal of Pediatric Surgery* [online]. 2012, 47(6), 1204-1207 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.03.028. ISSN 00223468.
 24. GERARD J. TORTORA, BERDELL R. FUNKE, CRISTINE L. CASE (2007). *Microbiology: an introduction*. [S.l.]: Pearson Benjamin Cummings. ISBN 0-321-39603-0
 25. BHATTACHARYYA B.K., Bromelain: An overview. *Natural Product Radiance*, 2008; 7(4); 359-363.
 26. ONKEN, Jane E., Paula K. GREER, Brian CALINGAERT a Laura P. HALE. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. *Clinical Immunology* [online]. 2008, 126(3), 345-352 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.clim.2007.11.002. ISSN 15216616.
 27. CHOBOTOVA, Katya, Ann B. VERNALLIS a Fadzilah Adibah Abdul MAJID. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters* [online]. 2010, 290(2), 148-156 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.08.001. ISSN 03043835.

28. ONKEN, Jane E., Paula K. GREER, Brian CALINGAERT a Laura P. HALE. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. *Clinical Immunology* [online]. 2008, 126(3), 345-352 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.clim.2007.11.002. ISSN 15216616.
29. KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0449-1.
30. BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii* [online]. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011 [cit. 2019-05-07]. ISBN 978-80-247-3533-7.
31. BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renata KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6. Skriptum. VFU Brno
32. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie : Pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Praha : Grada, 2010. 224 s. ISBN 978-80-247-3170-4.
33. Disk Diffusion Antibiotic Sensitivity Testing [online]. Dostupné z: <https://airfreshener.club/quotes/disk-diffusion-antibiotic-sensitivity-testing.html>
34. SANCHEZ, Martha L. a Ronald N. JONES. E test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiologic application. *Antimicrobic Newsletter*. 1992, vol. 8, issue 1, s. 1-7. DOI: 10.1016/0738-1751(92)90015-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0738175192900153>
35. Etest®. In: *Biomerieux diagnostics* [online]. 2013 [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/etest>
36. RYŠKOVÁ, Olga, et al. *Návody k praktickým cvičením z lékařské mikrobiologie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-307-5.
37. JULÁK, Jaroslav. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2009. 113 s. ISBN 978-80-246-1141-9.
38. KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 603 str.
39. Gram pozitivní [online]. In: . [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Gram_pozitivn%C3%AD.JPG
40. Gram negativní [online]. In: . [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Gram_negativn%C3%AD.JPG
41. JANDOVÁ, Božena a Ludmila KOTOUČKOVÁ. *Praktikum z mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 1996. ISBN 80-210-1374-5.
42. TAQIEDDIN, Ehab a Mansoor AMIJI. Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials* [online]. 2004, 25(10), 1937-1945 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.034. ISSN 01429612.
43. MISHRA, Munmaya K. *Handbook of encapsulation and controlled release*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an Informa business, [2016]. ISBN 9781482232325.
44. PAQUES, Jerome P., Erik VAN DER LINDEN, Cees J.M. VAN RIJN a Leonard M.C. SAGIS. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2014, 209, 163-171 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.cis.2014.03.009. ISSN 00018686.

45. VAHABI, Henri, Elaheh ROHANI RAD, Thibault PARPAITE, Valérie LANGLOIS a Mohammad Reza SAEB. Biodegradable polyester thin films and coatings in the line of fire: the time of polyhydroxyalkanoate (PHA)? Progress in Organic Coatings. 2019, 133(33), 85-89. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2019.04.044. ISSN 03009440.
46. ZHANG, Junyu, Ekaterina I. SHISHATSKAYA, Tatiana G. VOLOVA, Luiziana Ferreira DA SILVA a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. Materials Science and Engineering: C [online]. 2018, 86, 144-150 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.035. ISSN 09284931
47. CHEN, Guo-Qiang, Xin-Yu CHEN, Fu-Qing WU a Jin-Chun CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) toward cost competitiveness and functionality. Advanced Industrial and Engineering Polymer Research [online]. 2020, 3(1), 1-7 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.aiepr.2019.11.001. ISSN 25425048.
48. CHEN, Guo-Qiang a Qiong WU. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials [online]. 2005, 26(33), 6565-6578 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036. ISSN 01429612
49. CHENG, Ruoyu, Lili LIU, Yi XIANG, Yong LU, Lianfu DENG, Hongbo ZHANG, Hélder A. SANTOS a Wenguo CUI. Advanced liposome-loaded scaffolds for therapeutic and tissue engineering applications. Biomaterials [online]. 2020, 232 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119706. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961219308245>
50. GREGORIADIS, Gregory a PERRIE, Yvonne: Liposomes in nanomedicine, v Encyclopedia of Life Sciences (ELS). Chichester: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-1-118-54915-5
51. GUIMARÃES, Diana, Jennifer NORO, Ana LOUREIRO, Artur CAVACO-PAULO a Eugénia NOGUEIRA. Quantification of drugs encapsulated in liposomes by ¹H NMR. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2019, 179, 414-420 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.039. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776519301882>
52. GALLEZ, Anne, Claudio PALAZZO, Silvia BLACHER, et al. Liposomes and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes formulations encapsulating 17 β -estradiol: An innovative drug delivery system that prevents the activation of the membrane-initiated steroid signaling (MISS) of estrogen receptor α . International Journal of Pharmaceutics [online]. 2020, 573 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118861. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731930906>
53. © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. Zetasizer Nano Series User Manual. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
54. ŠEVČÍKOVÁ, Petra; KAŠPÁRKOVÁ, Věra; KREJČÍ, Jiří, Vltavská Pavlína. DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ. Chemické listy [online]. 2014 [cit. 2019-05-07].
55. MIR, Mariam, Murtaza Najabat ALI, Afifa BARAKULLAH, Ayesha GULZAR, Munam ARSHAD, Shizza FATIMA a Maliha ASAD. Synthetic polymeric biomaterials for wound

healing: a review. Progress in Biomaterials [online]. 2018, 7(1), 1-21 [cit. 2020-07-28].
DOI: 10.1007/s40204-018-0083-4. ISSN 2194-0509. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s40204-018-0083-4>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	absorbance
ABTS	2,2–azinobis(3–ethylbenzothioazolin-6-sulfonoová kyselina)
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
DLS	Dynamic light scattering
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PdI	polydisperzní index
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>